意大利蜜蜂蜂毒磷脂酶 A_2 基因在杆状病毒-昆虫细胞系统中的表达

沈立荣，邢丽苹，张传溪*，程家安*

（浙江大学应用昆虫学研究所，杭州　310029）

摘要：利用 Bac to Bac 系统将意大利蜜蜂蜂毒磷脂酶 A_2（$AmPLA_2$）基因 cDNA 克隆至转移载体 pFastBacHTa 中，得到 pBacHT-$AmPLA_2$，再将其转化入含穿梭载体 Bacmid 的受体大肠杆菌 DH10Bac 中，通过转座作用，得到含 $AmPLA_2$ 基因的重组病毒 rBacmid-$AmPLA_2$ 的 DNA。提取其基因组 DNA，用脂质体介导转染粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4，得到重组病毒 rACV-Bac-$AmPLA_2$。用此重组病毒感染 Tn-5B1-4 细胞，在细胞中表达 $AmPLA_2$。SDS-PAGE 电泳结果显示，与 6×His Tag融合表达的产物蛋白分子量约为 18 kD 左右，表达量约占细胞总蛋白的 5.35%。Western blot 印迹显示，融合表达产物能与意大利蜜蜂蜂毒 $AmPLA_2$ 抗血清发生免疫反应。生物活性测定显示，含表达产物的细胞蛋白粗提物对底物蛋黄的酶活力约为 6.13 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$。

关键词：意大利蜜蜂；蜂毒；磷脂酶 A_2 基因；杆状病毒-昆虫细胞系统；表达

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2006)03-0367-06

Expression of phospholipase A_2 gene from the venom of *Apis mellifera* in the baculovirus-insect cell system

SHEN Li-Rong，XING Li-Ping，ZHANG Chuan-Xi*，CHENG Jia-An*（Institute of Applied Entomology，Zhejiang University，Hangzhou 310029，China）

Abstract：The cDNA encoding phospholipase A_2 of *Apis mellifera*（$AmPLA_2$）was cloned into a transfer vector pFastBacHTa to form the recombinant donor plasmid pBacHT-$AmPLA_2$. The recombinant donor plasmid was then transformed into *Escherichia coli* DH10Bac. By transposition，$AmPLA_2$ gene was integrated into Bacmid，and a recombinant shuttle vector，rBacmid-$AmPLA_2$ was constructed. The cultured *Trichoplusia ni* Tn-5B1-4 cells，mediated with Lipofectin，were transfected with the rBacmid-$AmPLA_2$ DNA，and then the recombinant baculovirus，rACV-Bac-$AmPLA_2$ was obtained. The recombinant virus was further used to infect the Tn-5B1-4 cells to express the target protein. SDS-PAGE analysis of the infected cellular proteins showed that the size of the expression product of $AmPLA_2$ fused with 6×His-tag at its N-terminal was about 18 kD，and the expressed protein accumulated up to about 5.35% of the total cellular proteins. Western blot analysis using anti-$AmPLA_2$ polyclonal serum confirmed the expressed protein was a fusion protein of $AmPLA_2$. The protein extracts of $AmPLA_2$ showed an enzymatic activity of about 6.13 $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ for hydrolyzing egg yolk substrate.

Key words：*Apis mellifera*；bee venom；phospholipase A_2 gene；baculovirus-insect cell system；expression

蜂毒磷脂酶 A_2（bee venom phospholipase A_2，$BvPLA_2$）是蜜蜂蜂毒（下称蜂毒）中含量仅次于溶血肽（melittin）的活性成分和过敏原（Habermann，1972）。按其来源和生化性质，它属于胞外分泌的

基金项目：国家自然科学基金项目(30271008)

作者简介：沈立荣，男，1960 年 7 月生，博士，副教授，主要从事昆虫资源与分子生物学研究，现工作单位为浙江大学生物系统工程与食品科学学院，E-mail：shenlirong@zju.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：chxzhang@zju.edu.cn；jacheng@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2005-09-11；接受日期 Accepted：2006-02-13

PLA_2 碱性糖蛋白，是一种水解天然磷脂的催化酶，可催化甘油磷脂的第二位脂酰键的水解，生成溶血磷脂和脂肪酸，与溶血肽起协同作用，产生较强的溶血活性，使红细胞溶解，因而被称为"间接的溶血毒素"(Schmidt，1982；Owen *et al*.，1990；Kelley *et al*.，1992)。在医学和细胞生物学实验研究中，磷脂酶 A_2 是研究生物膜、脂蛋白中磷脂结构等的重要工具酶(杜晓燕和周元聪，1997)，也是与治疗心肌梗死、类风湿性关节炎等疾病相关的活性成分，具有药物利用价值(Mukherjee *et al*.，1994；Eckey *et al*.，1997；Nakashima *et al*.，2004)。由于蜂毒磷脂酶 A_2 作为蜜蜂的防卫性毒素成分，具有一定的杀虫活性，如 Quistad 等(1988)曾用 $BvPLA_2$ 注射烟草天蛾 3 龄幼虫测定毒力，测得其 LD_{50} 为 158 μg/g，与溶血肽的毒力(LD_{50} 为 159 μg/g)同等；同时发现 $BvPLA_2$ 与溶血肽的混合液(二者比例为 10∶44)的 LD_{50} 为 32 μg/g，毒力高于粗蜂毒(76 μg/g)1 倍以上，显示 $BvPLA_2$ 在开发生物农药方面具有重要的应用价值。

自意大利蜜蜂 *Apis mellifera*（下称意蜂）蜂毒磷脂酶 A_2（$AmPLA_2$）在 1954 年被鉴定（Habermann，1972）以来，科研人员对其生化特性、作用机制、免疫学、蛋白晶体结构等已有一系列研究（Shiplini *et al*.，1974a，1974b；Weber *et al*.，1987；Scott *et al*.，1990）。Kuchler 等（1989）依据克隆的大小为 405 bp 的基因核苷酸序列精确确定了 $AmPLA_2$ 由 134 个氨基酸残基组成，Dudler 等（1992）曾采用人工合成的 $AmPLA_2$ 基因在大肠杆菌中进行了表达。近年我们采用构建毒腺文库和 RT-PCR 方法，先后从意蜂和中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 毒腺总 RNA 中克隆了 $BvPLA_2$、溶血肽等基因，并开展了基因重组表达（沈立荣等，2002，2004；Shi *et al*.，2004）、活体蜜蜂毒腺中溶血肽和 $BvPLA_2$ 的表达和调控（Li *et al*.，2005a，2005b）等一系列研究。本文报道了我们用杆状病毒-昆虫细胞系统表达 $AmPLA_2$ 基因的结果，以为 $AmPLA_2$ 开发提供一个新的可能途径。

1 材料与方法

1.1 材料

含 $AmPLA_2$ 基因（405 bp）的载体质粒 pGEM-$AmPLA_2$ 由本实验室构建（沈立荣等，2002）；粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 细胞系 Tn-5B1-4（下称 Tn 细胞），由本实验室保存；Bac to Bac 杆状病毒-昆虫细胞表达系统购自 Invitrogen 公司。健康雄性大白兔由浙江中医学院实验动物中心提供。

1.2 试剂

脂质体 Lipofectin、胎牛血清购自 Invitrogen 公司，昆虫细胞培养基 TNM-FH 和天然纯抗原 $AmPLA_2$、完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂为 Sigma 公司产品，意蜂粗毒干粉购自浙江省缙云县养蜂协会；SDS-PAGE 电泳中等分子量标准蛋白、*Taq* DNA Polymerase、羊抗兔 IgG-AP 二抗、NBT/BCIP 购自 Promega 公司，硝酸纤维素滤膜（NC 膜）购自 Milipore 公司，脱氧胆酸钠、牛血清蛋白（BSA）购自上海生工生物工程公司；限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ 和 *Hin*d Ⅲ、IPTG、X-gal、低熔点琼脂糖（LMP）、DL2000 分子量标准核酸购自 TaKaRa 宝生物工程（大连）公司。所用抗生素卡那霉素、庆大霉素、四环素及常规试剂为国产分析纯产品。

1.3 方法

1.3.1 PCR 引物设计：克隆 $AmPLA_2$ 成熟肽编码区的引物 PLA_2F/PLA_2R 根据 Kuchler 等（1989）报道的基因 $AmPLA_2$ 序列（GenBank 序列号：X16709）设计，由上海生工生物工程公司合成。引物序列如下：

正向引物 PLA_2F：5′-A<u>GAATTC</u>ATGATAATATATCCAGGAACG-3′（下划线处为 *Eco*R Ⅰ 位点）；

反向引物 PLA_2R：5′-G<u>AAGCTT</u>AATACTTGCGAAGATCG-3′（下划线处为 *Hin*d Ⅲ 位点）。

1.3.2 重组杆状病毒转移质粒 pBacHT-$AmPLA_2$ 的构建：将带有 $AmPLA_2$ 基因的载体质粒 pGEM-$AmPLA_2$ 用 *Eco*R Ⅰ 和 *Hin*d Ⅲ 进行双酶切，LMP 凝胶电泳回收大小为 400 bp 的目的片段，与事先经 *Eco*R Ⅰ 和 *Hin*d Ⅲ 双酶切的 pFastBacHTa 质粒连接，转化大肠杆菌 TG1，重组转移质粒 pBacHT-$AmPLA_2$ 经 *Eco*R Ⅰ 和 *Hin*d Ⅲ 双酶切，并以 $AmPLA_2$ 正向引物和反向引物作 PCR 鉴定确认。PCR 反应条件为 94℃ 变性 30 s，58℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，共进行 30 个循环，然后 72℃ 保温 5 min。

1.3.3 重组杆状病毒 rBacmid-$AmPLA_2$ 的构建：碱法提取重组转移质粒 pBacHT-$AmPLA_2$ 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH10Bac（含有经修饰的杆状病毒 Bacmid），在含有 IPTG、X-gal、卡那霉素、庆大霉素及四环素的平板上进行 2 轮筛选，挑取发生转座作用生成的白斑，提取重组 Bacmid 基因组 DNA，用 $AmPLA_2$ 正向引物和反向引物作 PCR 鉴定，筛选出重组病毒 rBacmid-$AmPLA_2$。

1.3.4　rBacmid-AmPLA$_2$ 转染昆虫细胞及转染后重组杆状病毒的 PCR 鉴定：提取重组 rBacmid-AmPLA$_2$ 的基因组 DNA，在 Lipofectin 介导下转染 Tn 细胞，经 3 天后收取有明显病毒感染症状的细胞上清，再次转染 Tn 细胞进行病毒扩增。经 4 次传代转染后，从收获 Tn 细胞抽提病毒 DNA 作为模板，用 AmPLA$_2$ 正向引物和反向引物作 PCR 鉴定后，在 4℃保存细胞上清用于再次转染 Tn 细胞（张传溪，2001）。

1.3.5　多克隆抗体的制备及效价测定：将天然纯抗原 AmPLA$_2$ 1 mg 溶解于 1 mL 双蒸水中，冷冻备用。挑选健康大白兔，用 AmPLA$_2$ 抗原溶液免疫大白兔 3 次：首次按每头兔取 200～300 μL AmPLA$_2$ 溶液量与等体积的完全弗氏佐剂混合乳化，作皮下注射；21 天后，按每头兔取 100～200 μL AmPLA$_2$ 液的量与等体积的不完全弗氏佐剂混合乳化，作皮下多点及腿部肌肉注射，进行加强免疫；再过 21 天后，按前一次加强免疫剂量，进行最后一次臀部肌肉注射。全部注射完 7 天后从兔耳抽取血清样，按倍比稀释，用琼脂糖双向扩散法测定效价。结果显示 1∶2∶4∶8 倍血清液都能与 1∶1 000 倍 AmPLA$_2$ 溶液产生免疫沉淀带，显示效价合适。然后取兔血并分离血清，分装后 −70℃保存备用，所得抗体即为 AmPLA$_2$ 多克隆抗体。

1.3.6　SDS-PAGE 电泳：取经 rBacmid-AmPLA$_2$ 感染 3 天后的 Tn 细胞，经 2 000 g/min 离心 3 min，弃上清液，PBS（pH 7.4）缓冲液洗涤沉淀 1～2 次。按 100 μL PBS 缓冲液/mL 感染液悬浮细胞，取出 10 μL 加等体积 2×SDS 上样缓冲液，进行 SDS-PAGE 电泳，浓缩胶浓度为 5%，分离胶浓度为 12%。其中以不含目的基因的 Bacmid 感染的 Tn 细胞作阴性对照，以 Sigma 产意蜂 AmPLA$_2$ 纯品作阳性对照。目的基因的表达量通过 SDS-PAGE 胶薄层扫描法测算。

1.3.7　Western blot 分析：参照 Sambrook 等（1989）的方法稍作改进，具体步骤为：首先将凝胶中的蛋白质分离后电转移至硝酸纤维素膜上，将膜用封闭缓冲液液（含 5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液）封闭 2 h，用 TBS 和 TBST 缓冲液交替洗膜 3 次；接着与一抗溶液（30 mL 封闭缓冲液＋一抗 10 μl）室温反应 1.5 h，用 TBST 洗膜 4 次；然后加入封闭液稀释的羊抗兔 IgG-AP 二抗（1∶500），室温反应 1.5 h，用 TBST 洗膜 3 次；最后将 NC 膜置于含 BCIP/NBI 的显色液中显色至条带清晰，将膜置蒸溜水中终止显色反应。取出晾干，拍照。

1.3.8　AmPLA$_2$ 酶活性的测定：参考 Owen 等（1990）和刘小龙等（2000）的方法改进，具体步骤为：取被 rBacmid-AmPLA$_2$ 感染的 Tn 细胞适量，加双蒸水适量，置冰上超声破碎，离心，取上清，用紫外分光光度计测定总蛋白浓度；以不含目的基因的 Bacmid 感染的细胞抽提物为阴性对照；以 Sigma 产意蜂 AmPLA$_2$ 纯品和国产意蜂粗蜂毒作为阳性对照。取一个新鲜鸡蛋黄加 200 mL 双蒸水，搅匀备用；取此蛋黄液 5 mL，加 0.03 mol/L $CaCl_2$ 1 mL，0.013 mol/L 脱氧胆酸钠 1 mL，5% BSA 1 mL，去离子水 2 mL，混匀，置 37℃恒温，用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 8.0，以此作为底物，然后分别加入待测样品液，混匀并同时计时（37℃恒温）；滴加 0.05 mol/L NaOH 溶液中和水解产生的脂肪酸，维持 pH 在 8.0，根据 1 mg 蛋白消耗的 NaOH 来计算底物中所释放的脂肪酸。酶活单位用 1 mg 酶每分钟释放出的脂肪酸（μg）来描述。

2　结果与分析

2.1　重组杆状病毒转移质粒的构建

将从 pGEM-AmPLA$_2$ 双酶切获得的粘末端目的基因片段回收纯化后，定向克隆入经同样双酶切的 pFastBacHTa 质粒中形成转移载体 pBacHT-AmPLA$_2$（图 1）。重组质粒经 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ双酶切和 PCR 扩增，均得到大小约为 400 bp 的片段，表明构建正确。由于 AmPLA$_2$ 基因插入转移质粒 pFastBacHTa 后，处在多角体蛋白基因强启动子（Ph promoter）控制下，并能与 Ni-NTA 树脂亲和纯化标记 6×His tag 融合表达，预计表达产物是 AmPLA$_2$ 的 N 端增加了 25 个氨基酸残基的融合蛋白。

2.2　重组病毒 rBacmid-AmPLA$_2$ 的构建

将重组杆状病毒转移载体质粒 pBacHT-AmPLA$_2$ 转化带有辅助质粒的大肠杆菌 DH10Bac，以重组菌抽提的 DNA 作为模板，用 AmPLA$_2$ 引物进行 PCR 检测，得到大小约为 400 bp（图 2：1，2）的片段，证明目的基因已与 Bacmid 发生重组，即已获重组病毒 rBacmid-AmPLA$_2$。

2.3　rBacmid-AmPLA$_2$ 与 Lipofectin 共转染 Tn 细胞

在无血清条件下，用 Lipofectin 介导 rBacmid-AmPLA$_2$ 的基因组 DNA 转染生长状态良好的 Tn 细胞。经连续 3 次传代转染后，细胞感染症状明显，生

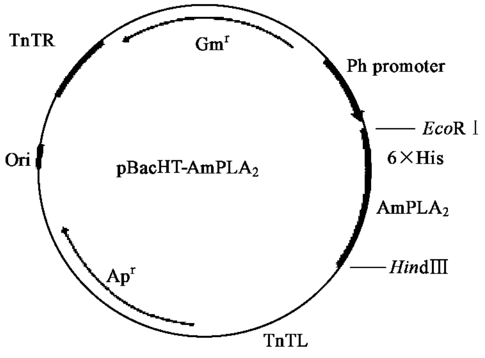

图 1 转移载体 pBacHT-AmPLA$_2$ 图谱

Fig. 1 Schematic representation of the donor vector

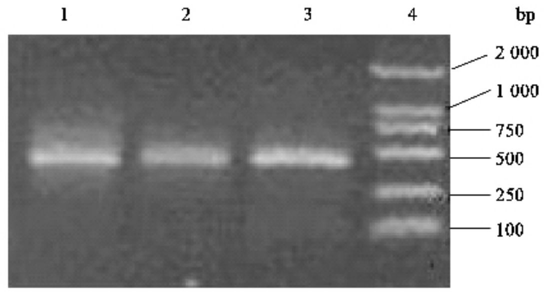

图 2 重组病毒 rBacmid-AmPLA$_2$ 的 PCR 检测

Fig. 2 PCR assay of rBacmid-AmPLA$_2$

1，2：rBacmid-AmPLA$_2$ PCR 产物 rBacmid-AmPLA$_2$ PCR product；3：pGEM-AmPLA$_2$ PCR 产物 pGEM-AmPLA$_2$ PCR product；4：DNA 标准分子量 DNA molecular weight marker（DL2000）.

长状态良好的梭形细胞感染后分裂停止，变为圆球状，大部分悬浮在培养液中（图 3）。

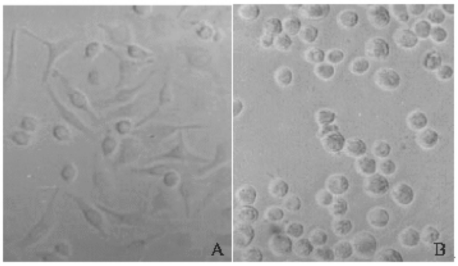

图 3 重组病毒感染前(A)和感染后 72 h (B) Tn 细胞状态比较

Fig. 3 Comparison of normal Tn cells（A）and cells infected with rBacmid-AmPLA2 72 h p. i.（B）

2.4 细胞中重组病毒粒子的 PCR 检测

传代转染 4 次以后，提取被 rBacmid-AmPLA$_2$ 转染的 Tn 细胞中的重组病毒 rACV-Bac-AmPLA$_2$ 的 DNA 为模板，用 AmPLA$_2$ 引物进行 PCR 检测，得到大小约为 400 bp 的片段，与预期目的基因 405 bp 大小相符（电泳结果同图 2）。证明重组病毒 rBacmid-AmPLA$_2$ 已在 Tn 细胞中进行了扩增。

2.5 SDS-PAGE 分析

收获被 rBacmid-AmPLA$_2$ 感染的 Tn 细胞，提取总蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳，考马氏亮蓝 R-250 染色，结果显示，与阴性对照（图 4A：5）相比较，被 rBacmid-AmPLA$_2$ 感染的 Tn 细胞在约 18 kD 处出现了特异性表达条带（图 4A：3，4，用箭头标出处），阳性对照（图 4A：2）也在泳道中出现了 2 条粗大的蛋白带，表明 AmPLA$_2$ 已在 Tn 细胞中表达。从该结果还可发现，AmPLA$_2$ 特异性表达条带与预期的 AmPLA$_2$ 融合蛋白分子量（约 17.5 kD）相近，但比目的蛋白的分子量（14.5 kD）要大，这是因为 Bac to Bac 杆状病毒是一个融合表达系统，重组病毒在 Tn 细胞中表达时，目的蛋白的 N-端连上了 25 个氨基酸残基（包括 6 个 His），分子量大小为 3 kD，这段序列有利于进行目的蛋白表达，并便于利用亲合层析进行蛋白纯化。经 SDS-PAGE 胶薄层扫描分析，该 18 kD 的 AmPLA$_2$ 融合蛋白条带在细胞总蛋白中约占 5.35%。

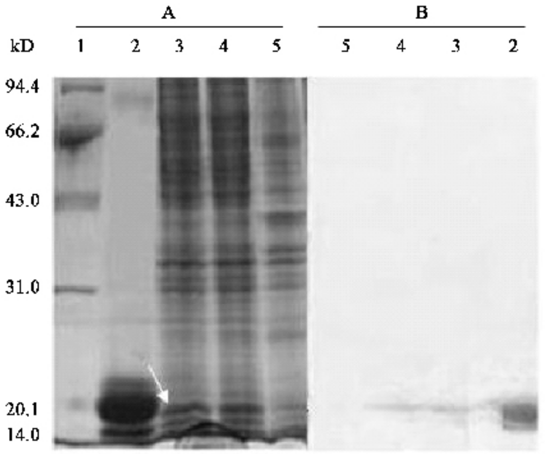

图 4 AmPLA$_2$ 在 Tn 细胞中表达产物的 SDS-PAGE（A）和 Western blot（B）分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis（A）and Western blot analysis（B）of AmPLA$_2$ expression products in Tn cells

1：蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker；2：Sigma 天然纯 AmPLA$_2$ native AmPLA$_2$ from Sigma；3，4：感染 rBacmid-AmPLA2 的 Tn 细胞抽提物（表达条带用白色箭头标出）Extracts from Tn cells infected with rBacmid-AmPLA$_2$（the expressed band was indicated with white arrow）；5：感染 Bacmid 的 Tn 细胞抽提物 Extracts from Tn cells infected with Bacmid

2.6 Western blot 分析

为进一步检验表达得到的蛋白是否为目的基因的表达产物，以兔抗天然纯 AmPLA$_2$ 多克隆抗体为

一抗，碱性辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗，对 rBacmid-AmPLA$_2$ 在 Tn 细胞中的表达产物进行 Western blot 分析。结果表明，rBacmid-AmPLA$_2$ 表达的 18 kD 蛋白(图 4B：3，4)和天然纯 AmPLA$_2$(图 4B：2)同样与兔抗天然纯 AmPLA$_2$ 多抗血清产生了明显的交叉反应，而阴性对照(图 4B：5)则未显示交叉反应。该结果进一步证明，rBacmid-AmPLA$_2$ 表达产物中的 18 kD 蛋白条带含有目的基因表达产物。

2.7　AmPLA$_2$ 酶活性检测

AmPLA$_2$ 酶活力测定结果见表 1，天然纯 AmPLA$_2$ 和粗蜂毒显示很强的 PLA$_2$ 酶活性，经 rBacmid-AmPLA$_2$ 转染 3 天后的 Tn 细胞蛋白抽提物的 PLA$_2$ 酶活力约为 6.13 μmol·min^{-1}·mg^{-1}，而阴性对照未显示 PLA$_2$ 酶活性，表明与 His Tag 融合表达的 AmPLA$_2$ 产物具有 PLA$_2$ 酶活性。按前述目的蛋白占细胞蛋白总量的 5% 左右的表达量估计，单位纯重组 AmPLA$_2$ 的酶活力大致为细胞蛋白总量的 20 倍，即 122.6 μmol·min^{-1}·mg^{-1}，为 AmPLA$_2$ 天然纯品酶活力的 63.27%。

表 1　表达产物 AmPLA$_2$ 酶活力测定结果

Table 1　Enzymatic activity of the expressed AmPLA$_2$

样品 Sample	酶活力 Enzymatic activity (μmol·min^{-1}·mg^{-1})
天然纯 AmPLA$_2$ Native AmPLA$_2$	193.75 ± 8.84
意蜂粗蜂毒 Native bee venom	15.84 ± 1.18
感染 rBacmid-AmPLA$_2$ 的 Tn 细胞抽提物 Extracts from Tn cells infected with rBacmid-AmPLA$_2$	6.13 ± 1.13
感染 Bacmid 的 Tn 细胞抽提物 Extracts from Tn cells infected with rBacmid-AmPLA$_2$	0.00

3　讨论

AmPLA$_2$ 是生物活性较强的一种 PLA$_2$ 酶，具有较高的医药和生物农药应用价值。美国 Sigma 公司已将从天然粗蜂毒中分离纯化的 AmPLA$_2$ 开发成商品化试剂，已在科学研究和医学领域广泛应用，但价格昂贵。因此研究利用生物反应器生产 AmPLA$_2$ 具有重要的实用意义。虽然 Dudler 等（1992）已用人工合成的 AmPLA$_2$ 基因在大肠杆菌中进行了表达，但其研究中仅用养蜂人的血清作为第一抗体进行了初步的 ELISA 分析，未见用特异性抗体对表达产物进行更为可靠的 Western blot 分析。而以往报道中也尚未见采用从意蜂毒腺直接克隆获得 AmPLA$_2$ 基因进行重组表达的相关研究。为此作者曾研究在大肠杆菌中表达 AmPLA$_2$ 基因(沈立荣等，2004)。但由于在原核生物大肠杆菌中的表达产物通常以包涵体形式存在，需要经过复性处理才表现出有限的活性，表达产物活性较低，因此利用大肠杆菌表达 AmPLA$_2$ 基因存在很大的局限性。杆状病毒-昆虫表达系统(baculovirus expression vector system，BEVS)是一种高效的真核表达系统，与大肠杆菌表达系统相比，它具有表达量大，可进行蛋白转录后加工修饰等优点。AmPLA$_2$ 是来自昆虫的一种糖蛋白，因此选择杆状病毒-昆虫表达系统进行表达研究更具有优势。

AmPLA$_2$ 基因可编码 134 个氨基酸残基，在 Bac to Bac 杆状病毒表达系统中的 His Tag 融合表达产物为增加了 25 个氨基酸残基、分子量约 18 kD 的融合蛋白；而 AmPLA$_2$ 天然纯品的理论分子量大小为 14.5 kD。从文中 SDS-PAGE 图谱可见，感染 Bacmid-AmPLA$_2$ 在 Tn 细胞中表达产物的分子量约为 18 kD，与 AmPLA$_2$-His Tag 融合蛋白分子量的理论推算值基本相符，可见表达产物并没有经过很大的后加工修饰。但图 4 中 AmPLA$_2$ 天然纯品至少有 2 条分子量大小接近或大于 18 kD 的蛋白条带，与理论值不符。我们曾对活体意蜂毒液中 4 种 SDS-PAGE 和 Western blot 带型不同的 AmPLA$_2$ 蛋白条带进行了 N 末端氨基酸序列测定，结果发现所有 AmPLA$_2$ 条带的氨基酸序列是一致的，造成分子量差异的原因是 AmPLA$_2$ 的不同程度糖基化所致，而意蜂毒液内的 AmPLA$_2$ 是 4 种糖基化程度不同的糖蛋白的混合体(Li *et al*.，2005b)。Kubelka 等（1993）的研究表明，AmPLA$_2$ 属 N 聚糖类型的糖蛋白，糖链共价结合于 13 位的天冬酰胺上。糖链与 AmPLA$_2$ 糖蛋白的过敏性和免疫原性有关，但它并不影响 AmPLA$_2$ 水解天然磷脂的酶功能（Weber *et al*.，1986，1987)。在昆虫细胞中表达的 AmPLA$_2$ 虽然糖基化程度不高，但仍有明显的脂酶功能。

虽然杆状病毒-昆虫表达系统晚期基因表达是在病毒粒子形成之后，有利于细胞毒性蛋白的表达(张传溪，2001)，但我们在实验中发现，AmPLA$_2$ 基因表达产物对昆虫细胞仍会产生较明显的细胞毒性。感染 rBacmid-AmPLA$_2$ 的 Tn 细胞通常比同期实验表达其他基因的细胞存活期较短，因此可能使 AmPLA$_2$

蛋白的表达量受到影响。

用抗 AmPLA$_2$ 天然纯品的特异性抗血清作为一抗对表达产物所作 Western blot 分析结果表明，表达产物与天然纯品 AmPLA$_2$ 显示同样的交叉反应，即表现出很强的免疫活性，与 Dudler 等（1992）的结果相比，显得更为直观而可靠。生物活性测定结果，融合表达蛋白 AmPLA$_2$ 与天然纯品 AmPLA$_2$ 显示类似活性。这项工作为 AmPLA$_2$ 的进一步研究利用提供了依据。

致谢　实验得到本所武家才、朱光辉、刘艳荷、王芳等同学的热心协助，特此致谢。

参 考 文 献（References）

Dudler T，Chen WQ，Wang SS，Schneider T，Annand RR，Dempcy RO，Crameri R，Gmachl M，Suter M，Gelb MH，1992. High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A_2. *Biochim. Biophys. Acta*，1 165(2)：201－210.

Du XY，Zhou YC，1997. New reviews on the physical function of phospholipase A_2. *Chemistry of Life*，17：12－14.［杜晓燕，周元聪，1997. 磷脂酶 A_2 的生理机能新说. 生命的化学，17：12－14］

Eckey R，Menschikowski M，Lattke P，Jaross W，1997. Minimal oxidation and storage of low density lipoproteins result in an increase susceptibility to phospholipid hydrolysis by phospholipase A_2. *Arterioscleosis*，132：165－176.

Habermann E，1972. Bee and wasp venoms. *Science*，177：314－322.

Kelley MK，Crowl RM，Dennis EA，1992. Renaturation of cobra venom phospholipase A_2 expressed from synthetic gene in *Escherichia coli*. *Biochemica et Biophysica Acta*，1 118：107－115.

Kuchler K，Gmachl M，Sippl MJ，Krell G，1989. Analysis of the cDNA for phospholipase A_2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur. J. Biochem.*，184：249－254.

Kubelka V，Almann F，Staudacher E，Tretter V，Marz L，Hard K，Kamerling JP，Vliegenthart JF，1993. Primary structures of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A_2. *Eur. J. Biochem.*，213：1 193－1 204.

Li JH，Zhang CX，Tang ZH，2005a. Expression of melittin gene in the venom gland of the Chinese honeybee，*Apis cerana cerana*. *Apidologie*，36：533－541.

Li JH，Zhang CX，Shen LR，Tang ZH，Cheng JA，2005b. Expression and regulation of phospholipase A_2 in venom gland of the Chinese honeybee，*Apis cerana cerana*. *Archiv. Insect Biochem. Physio.*，60：1－12.

Liu XL，Zhong XY，Wu XF，Zhou YC，2000. Expression and biochemical characterization of a basic phospholipase A_2 from *Agkistrodon acutus*. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.*，27（3）：270－273.［刘小龙，钟晓燕，吴祥甫，周元聪，2000. 尖吻蝮蛇毒碱性磷脂酶 A_2 的表达及其生化特征. 生物化学与生物物理进展，27(3)：270－273］

Mukherjee AB，Miele L，Pattabiraman N，1994. Phospholipase A_2 enzymes：regulation and physiological role. *Biochem. Pharmacol.*，48：1－10.

Nakashima S，Kitamoto K，Arioka M，2004. The catalytic activity，but not receptor biding of sPLA(2)s plays a critical role for neurotic outgrowth induction in PC12 cells. *Brain Res.*，1 015：207－211.

Quistad GB，Skinner WS，Schooley DA，1988. Venom of social Hymenoptera－toxicity to the Lepidopteran，*Manduca sexta*. *Insect Biochem.*，18：511－514.

Owen MD，Pfaff LA，Reisman RE，Wypych J，1990. Phospholipase A_2 in venom extracts from honey bees（*Apis mellifera* L.）of different ages. *Toxicon*，28：813－820.

Sambrook KJ，Fritsch EF，Maniatis T，1989. Molecular Cloning：A Laboratory Manual. 2nd ed. New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmidt JO，1982. Biochemistry of insect venoms. *Ann. Rev. Entomol.*，27：339－368.

Scott DL，Otwinowski Z，Geib MH，Sigler PB，1990. Crystal structure of bee-venom phospholipase A_2，a complex with a transition-state analogue. *Science*，250：1 563－1 566.

Shen LR，Zhang CX，Cheng JA，2002. Cloning and sequencing of genes encoding phospholipase A_2 from the venom of *Apis cerana cerana* and *A. mellifera*. *J. Agri. Biotech.*，10(1)：29－32.［沈立荣，张传溪，程家安，2002. 中华蜜蜂、意大利蜜蜂蜂毒磷脂酶 A_2 基因的克隆及序列分析. 农业生物技术学报，10(1)：29－32］

Shen LR，Cheng JA，Zhang CX，Wu JY，2004. Expression of a bee-venom phospholipase A_2 from the venom of *A. mellifera*. *J. Zhejiang University*（*Agric. & Life Sci.*），30(1)：89－92.［沈立荣，程家安，张传溪，吴建祥，2004. 意大利蜜蜂蜂毒磷脂酶 A_2 基因在大肠杆菌中的表达. 浙江大学学报(农业与生命科学版)，30(1)：89－92］

Shi WJ，Xu HJ，Cheng JA，Zhang CX，2004. Expression of the melittin gene of *Apis cerana cerana* in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*，37：213－219.

Shiplini RA，Callewaert GL，Cotterl RC，Vernon CA，1974a. The primary sequence of phospholipase A_2 from bee venom. *FEBS Lett.*，17：39－40.

Shiplini RA，Doonan S，Vernon CA，1974b. The disulfide bridge of phospholipase A_2 from bee venom. *Eur. J. Biochem.*，48：465－476.

Weber A，Marz L，Altmann F，1986. Characteristics of the asparagines-linked oligosaccharide from honey-bee venom phospholipase A_2. Evidence for the presence of terminal N-acetylglucosamine and fucose in an insect glycoprotein. *Comp. Biolchem. Physiol. B.*，83（2）：321－324.

Weber A，Schroder H，Thalberg K，Marz L，1987. Specific interaction of IgE antibodies with a carbohydrate epitope of honeybee venom phospholipase A_2. *Allergy*，42（6）：464－470.

Zhang CX，2001. Analysis of Baculovirus Polyhedrin Gene and Protein Kinase Gene and Expression of Human Erythroprotein Gene in Baculovirus-insect System. Beijing：Higher Education Press. 1－287.［张传溪，2001. 昆虫杆状病毒 *ph*、*pk* 基因分析和人 EPO 基因在杆状病毒-昆虫系统中的表达. 北京：高等教育出版社. 1－287］

（责任编辑：吴明宇）